动 物 学 研 究 2001, Apr. 22 (2): 105～109 CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853
Zoological Research

雄烯二酮和甲基睾酮诱导雄性日本鳗鲡性腺发育的作用

张利红[①] 张为民 林浩然
(中山大学生命科学学院 广州 510275)

摘要：多次埋植雄激素雄烯二酮（ADSD）或甲基睾酮（MT）均可促进雄性日本鳗鲡（*Anguilla japonica*）性腺发育成熟，明显提高脑和垂体 mGnRH、垂体 GtH 含量。埋植 3 次后，MT 处理组的 GSI 及垂体 GtH 含量显著高于 ADSD 处理组。MT 处理组血清 GtH 含量在第 1 次埋植后显著升高，而 ADSD 处理组在第 4 次埋植后才显著高于对照组。这些结果表明：埋植 ADSD 和 MT 可反馈作用于雄性日本鳗鲡脑和垂体，促进 GnRH 和 GtH 的合成和分泌，进一步诱导精巢发育成熟；而且 MT 的作用效果较 ADSD 快。

关键词：日本鳗鲡；雄激素；促性腺激素释放激素；促性腺激素；反馈调节
中图分类号：Q959.46+9 **文献标识码**：A **文章编号**：0254－5853(2001)02－0105－05

鳗鲡的人工繁殖是至今尚未解决的世界性难题。鳗鲡繁殖生物学知识不足是限制这一问题解决的重要原因。在日本鳗鲡（*Anguilla japonica*）中，应用外源激素处理（鱼类脑垂体匀浆、HCG、性类固醇激素等）诱导性腺发育的研究表明，雌鳗的性腺较雄鳗更难诱导成熟(林浩然等，1999；Lin *et al*.，1998；Miura *et al*.，1991a)。因此，对雌鳗性腺发育机理的研究一直引起较多的关注，而对雄鳗的研究则相对较少。但在人工繁殖中，必须同时获得成熟的雄鳗和雌鳗，因此，开展雄鳗人工催熟的研究也很重要。已有的研究表明，埋植雄激素 ADSD 和 MT 对性未成熟的雄性日本鳗鲡的性腺发育有明显促进作用（林浩然等，1999；Lin *et al*.，1998）。但是，在诱导雄性日本鳗鲡性腺发育过程中，多次埋植 ADSD 或 MT 对脑部 GnRH 及垂体 GtH 合成和释放的影响，以及这 2 种雄激素对雄鳗性腺发育作用效果的比较还未见详细报道。本文采用间隔 15 d 多次埋植 ADSD 或 MT 的方法诱导雄性日本鳗鲡性腺发育，比较这 2 种雄激素的诱导效果，并通过测定脑部和垂体 GnRH 含量、垂体和血清 GtH 含量的变化，探讨雄性日本鳗鲡性腺发育的内分泌调节机理。

1 材料和方法

实验鱼为体重 120～250 g 的雄性下海日本鳗鲡，于 1995 年 10 月从广东省番禺市附近的珠江口选购。蓄养在室内人工海水循环系统中，人工海水采用中国科学院南海海洋研究所研制的海水晶配制而成，盐度为 30‰～34‰，自然光照，实验期间水温变化范围是 15～26℃。

雄烯二酮(4-androstene-3,17-dine,ADSD)和甲基睾酮(17α-methyl-testosterone,MT)为美国 Sigma 公司产品。将 ADSD 或 MT 和硅塑料混合后，制成 1.5 mm×1.5 mm×30 mm 的药条，以 50 μg/g 体重的剂量，每间隔 15 d 埋植在雄鳗腹腔内，对照组埋植不含激素的硅塑料条。每次埋植前，用手指轻压雄鳗腹部，如有精液流出，则认为性腺已发育成熟；并从尾静脉取血，血样在 4℃下静置 2 h 后离心，分离血清并存放在－20℃冰箱中待测 GtH 含量。第 3、6 次埋植 15 d 后，解剖鱼体，称体重和性腺重，计算性腺成熟系数(GSI＝性腺重/体重×100%)；取脑和垂体存放在－20℃以备进一步处理、待测 mGnRH 和 GtH 含量。脑和垂体 mGnRH 的抽提参照 Yu *et al*.(1987)的方法稍加修改。组织在1 mL冰浴的2 mol/L

收稿日期：2000－08－25；修改稿收到日期：2000－09－28
基金项目：国家自然科学基金（No.39770101）和 1996 年度高校博士点专项科研基金资助项目
①通讯联系人地址：广州中山大学生命科学学院生物系，510275. Tel：(020) 84110828。Email：ls65@zsu.edu.cn.

乙酸中用超声波匀浆,在4℃下以15 000 g离心20 min,收集上清液冰冻干燥。测定mGnRH含量前,重新溶解在磷酸缓冲液中。mGnRH测定参照Dufour *et al*.(1993)建立的欧洲鳗鲡GnRH的测定方法,以mGnRH为标准品和标记抗原,用氯氨T法对mGnRH进行I^{125}标记。mGnRH抗体由南非开普顿大学King博士惠赠,其与鲑鱼GnRH、鸡类GnRH-Ⅱ的免疫交叉反应小于0.4%。血清GtH含量的测定采用林浩然等(1987)建立的GtH放射免疫测定法。差异的显著性采用Student's *t*检验。

2 结 果

2.1 埋植ADSD和MT对雄性日本鳗鲡性腺发育的作用

间隔15 d分别多次埋植ADSD和MT均可促进雄性日本鳗鲡的性腺发育成熟(表1,图1)。埋植3次后,ADSD和MT处理组的雄鳗GSI显著高于对照组、MT处理组的GSI显著高于ADSD处理组(图1);MT处理组成熟率达41.67%,而ADSD处理组仅20.83%(表1)。埋植6次后,ADSD和MT处理组雄鳗的性腺进一步发育,GSI和成熟率继续增加,ADSD和MT处理组的GSI分别为(6.35±3.1)%和(7.89±2.4)%,两者间没有显著差异,MT组的成熟率达到88.89%,ADSD处理组的成熟率也增至77.78%。

表1 埋植ADSD和MT对雄性日本鳗鲡性成熟率的影响

Table 1 Effect of ADSD and MT on maturation rate of the male eel

组别 (group)	对照组 (control)	ADSD处理组 (ADSD-treated)	MT处理组 (MT-treated)
埋植3次 (3 implantations):			
总尾数 (total number of eel)	12	24	24
成熟鱼尾数 (number of matured)	0	5	10
成熟率 (maturation rate) /%	0	20.83	41.67
埋植6次 (6 implantations):			
总尾数 (total number of eel)	6	18	18
成熟鱼尾数 (number of matured)	0	14	16
成熟率 (maturation rate) /%	0	77.78	88.89

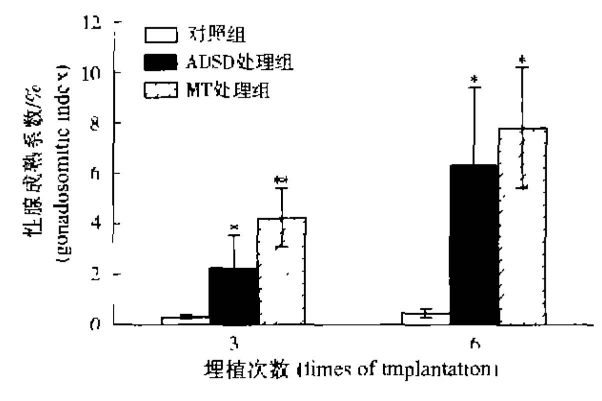


图1 埋植ADSD和MT对雄性日本鳗鲡GSI的影响

Fig.1 Effects of implantations of ADSD and MT on GSI in male silver eel

各值表示为平均值±标准差($n=6$)。*显著高于对照组($P<0.01$);**显著高于对照组($P<0.01$)和ADSD处理组($P<0.05$) [bars represent means ± *SD* ($n=6$). * Significantly higher than the controls ($P<0.01$); ** Significantly higher than the controls ($P<0.01$) and ADSD-treated eels ($P<0.05$)]。

2.2 埋植ADSD和MT对雄性日本鳗鲡脑部和垂体mGnRH合成和分泌的影响

如图2所示,间隔15 d分别多次埋植ADSD和MT明显提高了雄鳗脑部和垂体mGnRH含量。埋植3次后,ADSD和MT处理组的雄鳗脑部和垂体mGnRH含量显著高于对照组;埋植6次后,其脑部和垂体mGnRH含量进一步增加,但2组间没有显著差异。这表明埋植ADSD和MT显著地促进了mGnRH的合成。

2.3 埋植ADSD和MT对雄性日本鳗鲡垂体和血清GtH合成和分泌的影响

2.3.1 埋植ADSD和MT对雄性日本鳗鲡垂体GtH含量的影响 如图3所示,埋植3次后,ADSD和MT处理组的垂体GtH含量均显著高于对照组,且MT处理组显著高于ADSD处理组;埋植6次后,ADSD和MT处理组雄鳗的垂体GtH含量继续升高,显著高于对照组,但2处理组间无显著差别。

2.3.2 埋植ADSD和MT对雄性日本鳗鲡血清GtH含量的影响 如图4所示,MT处理组的血清GtH含量在第1次埋植后就显著高于对照组;而ADSD处理组的血清GtH含量随埋植次数的增加而缓慢增加,在第4次埋植后才显著高于对照组;而且第1、2次埋植后,MT处理组的血清GtH含量显著高于ADSD处理组,埋植3次后,2处理组间无显著差别。

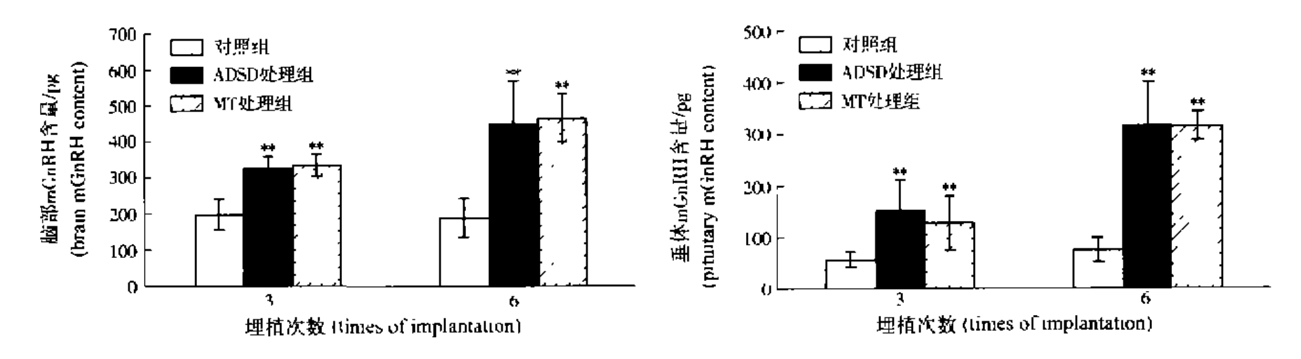


图 2 埋植 ADSD 和 MT 对雄性日本鳗鲡脑部和垂体 mGnRH 含量的影响

Fig.2 Effects of implantations of ADSD and MT on mGnRH content in the brain and pituitary of male silver eel

各值表示为平均值 ± 标准差（$n=6$）。** 显著高于对照组（$P<0.01$）[bars represent means ± *SD* ($n=6$). ** Significantly higher than the controls ($P<0.01$)]。

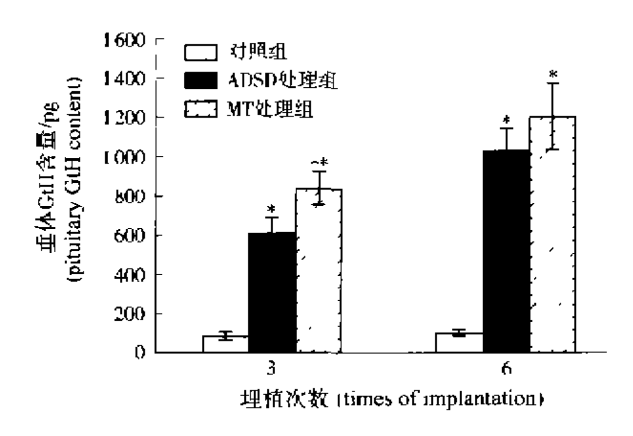


图 3 埋植 ADSD 和 MT 对雄性日本鳗鲡垂体 GtH 含量的影响

Fig.3 Effects of implantations of ADSD and MT on GtH content in the pituitary of male silver eel

各值表示为平均值 ± 标准差（$n=6$）。* 显著高于对照组（$P<0.01$）；** 显著高于对照组（$P<0.01$）和 ADSD 处理组（$P<0.05$）[bars represent means ± *SD* ($n=6$). * Significantly higher than the controls ($P<0.01$); ** Significantly higher than the controls ($P<0.01$) and ADSD-treated eels ($P<0.05$)]。

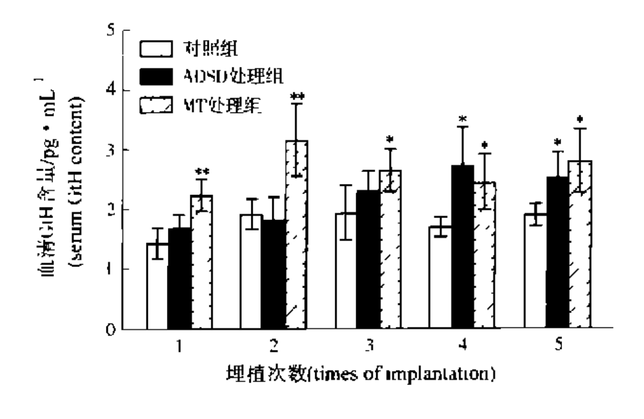


图 4 埋植 ADSD 和 MT 对雄性日本鳗鲡血清 GtH 含量的影响

Fig.4 Effects of implantations of ADSD and MT on serum GtH content of male silver eel

各值表示为平均值 ± 标准差（$n=6$）。* 显著高于对照组（$P<0.05$）；** 显著高于对照组和 ADSD 处理组（$P<0.05$）[bars represent means ± *SD* ($n=6$). * Significantly higher than the controls ($P<0.05$); ** Significantly higher than the controls and ADSD-treated eels ($P<0.05$)]。

3 讨论

与其他硬骨鱼类一样，日本鳗鲡生殖活动受到下丘脑 GnRH、垂体 GtH 和性类固醇激素的调节。已有研究表明，mGnRH 在日本鳗鲡的生殖活动中起着重要的调节作用。注射鲤鱼垂体匀浆液和 HCG 可显著增加雌雄鳗鲡脑部 mGnRH 含量和血清 GtH 含量，促进性腺发育成熟（汪小东等，2000）。在雌鳗中埋植 ADSD 可提高脑和垂体 mGnRH、垂体和血清 GtH 及血清类固醇激素含量，促进性腺发育成熟（张利红等，2000；Lin *et al*.，1998）。在雄鳗中埋植 ADSD 和 MT 也可提高垂体和血清 GtH 含量，促进性腺发育成熟（Lin *et al*.，1998）；HCG 或 11－酮基睾酮可诱导离体培养的雄鳗精巢的精子发生（Miura *et al*.，1991b，c）。

本实验中，多次埋植雄激素 ADSD 和 MT 均有效促进雄性日本鳗鲡的性腺发育成熟。这与我们以前报道的结果一致（林浩然等，1999；Lin *et al*.，1998）。埋植 ADSD 和 MT 后雄鳗脑部和垂体 mGnRH、垂体和血清 GtH 含量均显著升高，说明 ADSD 和 MT 可通过反馈调节作用，促进雄鳗脑部 mGnRH 和垂体 GtH 的合成和分泌，进而诱导精巢发育成熟。而且，ADSD 和 MT 也可能对精巢的发育有直接的促进作用（邓岳松，2000）。研究发现，雄激素 11－酮基睾酮、睾酮和 11β－羟睾酮可促进体外培育的雄性日本鳗鲡精巢的发育（Miura *et al*.，1991c）。MT 是人工

合成的睾酮类似物，在体内可转化为 11－酮基睾酮。睾酮可促进离体培养的底鳉（*Fundulus heteroclitus*）的精巢发育（Cochran，1992）。MT 对斑点鮰（*Ictalurus punctatus*）和黑鳉（*Mollienisia latipinna*）精子发生有促进作用（Gannam & Lovell，1991；Van Den Hurt & Van Den Kant，1975），MT 也可诱导离体培养的雄性日本鳗鲡精巢精子发生的全过程（邓岳松，2000）。ADSD 是睾酮生物合成的前体，可转变为睾酮，睾酮再转化为 11－酮基睾酮。埋植 ADSD 后雄性日本鳗鲡血清睾酮含量明显升高（Lin *et al*.，1998）。ADSD 对离体培养的雄鳗精巢的精子发生也有一定的促进作用，但其作用比 MT 小（邓岳松，2000）。因此，ADSD 和 MT 还可能直接或通过其代谢产物作用于精巢，促进雄鳗精巢发育成熟。ADSD 和 MT 在雄鳗体内的代谢及它们对精巢发育的直接作用值得进一步研究。

本实验中，埋植 3 次后 MT 处理组雄鳗的 GSI 明显高于 ADSD 处理组，表明 MT 比 ADSD 更快地促进了雄鳗性腺发育，埋植 6 次后 2 处理组 GSI 间无显著差异。垂体 GtH 含量和血清 GtH 含量结果表明：在 ADSD 和 MT 诱导雄鳗性腺发育的前期，MT 比 ADSD 更有效的促进了 GtH 的合成与释放，但随着埋植次数的增加，2 处理组间 GtH 的合成和释放无显著差异。这可能是在埋植早期 MT 比 ADSD 能更有效促进雄鳗性腺发育的原因之一。ADSD 和 MT 均能促进雄鳗脑部 mGnRH 的合成，但 2 处理组间没有显著差异。因此，两者在雄鳗性腺发育早期对 GtH 合成和释放作用存在差异的原因也有待进一步研究。

参 考 文 献

Cochran R C，1992. *In vivo* and *in vitro* evidence for the role of hormones in fish spermatogenesis[J]. *J. Exp. Zool*，**261**：143－150

Deng Y S，2000. Hormonal induced gonadal development and maturation in cultivated Japanese eel（*Anguilla japonica*）[D]. Zhongshan University Ph. D Dissertation.［邓岳松，2000. 激素诱导塘养日本鳗鲡发育成熟的研究. 中山大学博士学位论文.］

Dufour S，Montero M，Le belle N *et al*，1993. Differential distribution and response to experimental sexual maturation of two forms of brain gonadotropin-releasing hormone（GnRH）in the European eel，*Anguilla anguilla*[J]. *Fish Physiol. Biochem*.，**11**：99－106.

Gannam A L，Lovell R T，1991. Effects of feeding 17α-methyl-testosterone，11-ketotestosterone，17β-estradiol，and 3，5，3′-triiodothyronine to channel catfish，*Ictalurus punctatus*[J]. *Aquaculture*，**92**：377－388.

Lin H R，Zhang M L，Zhang S M *et al*，1987. Studies on the breeding biology of the eel（*Anguilla japonica* Temminck & Schlegel）. Ⅳ. The gonadotropin secretion，gonadal development and ultrastructure of gonadotropic cell of the eel during process of induced maturatio[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*，**11**（4）：320－330.［林浩然，张梅丽，张素敏等，1987. 鳗鲡繁殖生物学研究Ⅳ. 人工催熟过程中下海鳗鲡的 GtH 分泌活动、性腺发育状况和脑垂体 GtH 细胞的超显微结构. 水生生物学报，**11**（4）：320～330.］

Lin H，Xie G，Zhang L *et al*，1998. Artificial induction of gonadal maturation and ovulation in the Japanese eel（*Anguilla japonica* T et S.）[J]. *Bull. Fr. Peche. Piscic*，**349**：163－176.

Lin H R，Xie G，Zhang L H *et al*，1999. The action mechanisms of hormones induced gonadal maturation and ovulation in the Japanese eel（*Anguilla japonica*）[A]. Zoological Research of China[C]. Beijing：Chinese Forestry Press. 42－47.［林浩然，谢 刚，张利红等，1999. 激素诱导鳗鲡性腺发育成熟和排卵的作用机理. 中国动物科学研究. 北京：中国林业出版社. 42～47.］

Miura T，Yamauchi K，Nagahama Y *et al*，1991a. Induction of spermatogenesis in male Japanese eel，*Anguilla japonica*，by a single injection of human chorionic gonadotropin[J]. *Zool. Sci*，**8**：63－73

Miura T，Yamauchi K，Takahashi H *et al*，1991b. Human chorionic gonadotropin induces all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel（*Anguilla japonica*）[J]. *Dev. Biol*.，**146**：258－262.

Miura T，Yamauchi K，Takahashi H *et al*，1991c. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel（*Anguilla japonica*）[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，**88**：5774－5778.

Van Den Hurk R，Van De Kant H，1975. The effect of methyltestosterone，11-ketotestosterone and methallibure on gonadotropic cells，leydig cells，spermatogenesis and the epithelium of the intratesticular efferent duct system of the juvenile black molly（*Mollienisia latipinna*）[J]. *Proc. Kned. Akad. Wet. Ser C*.，**78**：275－286.

Wang X D，Lin H R，Xie G，2000. Effect of combinative injection of carp pituitary extraction and human chorionic gonadotropin on brain gonadotropin-releasing hormone and serum gonadotropin and sex steroids contents in *Anguilla japonica*[J]. *Journal of Fisheries China*，**24**（2）123－129.［汪小东，林浩然，谢 刚，2000. 鲤脑垂体匀浆液和人绒毛膜促性腺激素混合注射对鳗鲡脑区促性腺激素释放激素和血清促性腺激素及性类固醇激素含量的影响. 水产学报，**24**（2）123～129.］

Yu K L，Nahorniak C S，Peter R E *et al*，1987. Brain distribution of radioimmunoassayable gonadotropin-releasing hormone in female goldfish：seasonal variation and periovulatory changes[J]. *Gen. Com. Endocrinol*，**67**：234－246.

Zhang L H，Zhang W M，Lin H R，2000. The feedback effects of 4-androstene-3，17-dine and 17α-methyl-testosterone on gonadal development in the female silver eel，*Anguilla japonica* T & S[J]. *Journal of Fisheries China*，**24**（5）：407－411.［张利红，张为民，林浩然，2000. 雄烯二酮和甲基睾酮诱导雌性日本鳗鲡性腺发育的反馈调节作用. 水产学报，**24**（5）：407～411.］

Effects of 4-Androstene-3, 17 -Dine and 17α-Methyl-testosterone on Induction of Gonadal Maturation in the Male Japaneses Eel (*Anguilla japonica*)

ZHANG Li-Hong　ZHANG Wei-Min　LIN Hao-Ran

(*Biology Department, Zhongshan University, Guangzhou* 510275, *China*)

Abstract: The effects of 4-androstene-3, 17 -dine (ADSD) and 17α-methyl-testosterone (MT) via implantation at intervals of 15 days on maturation of the male silver eel, and their effects on brain and pituitary GnRH levels, pituitary and serum GtH levels were studied. Multiple implantations of ADSD and MT increased the GSI and stimulated gonadal maturation of the male silver eel. After 3 implantations, the GSI of males treated with MT were significantly higher than that treated with ADSD, whereas after 6 implantations their GSI were not significantly different. The mGnRH contents in the brain and pituitary were significantly increased after 3 and 6 implantations of ADSD and MT, and the mGnRH contents were elevated with increasing times of implantations. The pituitary GtH levels of male eels were significantly increased by multiple implantations of ADSD and MT, and after 3 implantations the pituitary GtH level of MT-treated male eels was significantly higher than that treated with ADSD. Serum GtH levels of MT-treated male eels were increased significantly after 1st implantation, however, serum GtH levels in the male eel treated with ADSD were significantly increased only after 4 implantations. Taken together, these results indicated that ADSD and MT could stimulate gonadal development and had positive feedback effects at the brain and pituitary in the male eel, and the higher potency of MT in the induction of gonadal development maybe due to its higher ability to stimulate GtH synthesis and release in the male eels.

Key words: *Anguilla japonica*; Androgen; Gonadotropin-releasing hormone; Gonadotropin; Feedback regulation